

Modified glucose dehydrogenase

Patent number: US6103509
Publication date: 2000-08-15
Inventor: SODE KOJI (JP)
Applicant: LIFESCAN INC (US)
Classification:
- international: C12N9/04
- european: C12N9/04
Application number: US19970923109 19970904
Priority number(s): JP19970061727 19970303

Also published as:
JP10243786 (A)

Abstract of US6103509

The invention provides a modified pyrrolo-quinoline quinone glucose dehydrogenase (PQQGDH) enzyme protein which is modified to have a substrate specificity to glucose. The modified PQQGDH of the invention exhibits a high substrate specificity compared to the wild type PQQGDH, thus is useful in determining glucose concentration in clinical assays and food analyses. A gene coding for the modified PQQGDH and a glucose sensor comprising the modified PQQGDH are also disclosed.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-243786

(43) 公開日 平成10年(1998) 9月14日

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	F I		
C12N 15/09	ZNA	C12N 15/00	ZNA	A
C07H 21/04		C07H 21/04		B
C12N 1/21		C12N 1/21		
9/04		9/04		D
C12Q 1/32		C12Q 1/32		
審査請求 未請求 請求項の数 2 F D (全 5 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平9-61727

(22) 出願日 平成9年(1997) 3月3日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成8年9月5日
社団法人日本生物工学会発行の「平成8年度 日本生物
工学会大会講演要旨集」に発表

(71) 出願人 596153357

早出 広司

東京都目黒区南1-13-16

(72) 発明者 早出 広司

東京都目黒区南1丁目13番16号

(54) 【発明の名称】 改変型グルコース脱水素酵素

(57) 【要約】

【構成】 大腸菌エシェリヒア・コリ (以下E. coli) 由来のピロロキノリンキノン (以下PQQ) を補酵素とするグルコース脱水素酵素 (以下GDH) の775番目のヒスチジン残基をアスパラギン、アスパラギン酸、セリン、チロシン、またはリジンから選択されるアミノ酸残基で置換した改変型PQQGDH酵素蛋白質をコードする遺伝子に基づき生産される改変型PQQGDH酵素蛋白質。

【効果】 改変型PQQGDHは基質特異性に優れ、グルコースに特異的に作用することから臨床検査や食品分析などにおけるグルコースの定量に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 大腸菌エシェリヒア・コリ（以下E. coli）由来のピロロキノリンキノン（以下PQQ）を補酵素とするグルコース脱水素酵素（以下GDH）の772番目から778番目のアミノ酸配列-Ala-Gly-Gly-His-Gly-Ser-Phe-の775番目のヒスチジン残基をアスパラギン、アスパラギン酸、セリン、チロシン、又はリジンから選択されるアミノ酸残基で置換した改変型PQQGDH酵素蛋白質をコードする遺伝子又は当該遺伝子を含むプラスミド。

【請求項2】 特許請求の範囲第1項記載の改変型PQQGDH構造遺伝子に基づき生産される改変型PQQGDH酵素蛋白質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は大腸菌エシェリヒア・コリ（以下E. coli）由来のピロロキノリンキノン（以下PQQ）を補酵素とするグルコース脱水素酵素（以下GDH）の特定のアミノ酸残基を人為的に他のアミノ酸残基で置換した改変型PQQGDHに関するものであり、より詳細にはE. coli由来のPQQGDHの772番目から778番目のアミノ酸配列-Ala-Gly-Gly-His-Gly-Ser-Phe-の775番目のヒスチジン残基をアスパラギン、アスパラギン酸、セリン、チロシン、又はリジンから選択されるアミノ酸残基で置換した改変型PQQGDH酵素蛋白質をコードする遺伝子又は当該遺伝子を含むプラスミド、および改変型PQQGDHの構造遺伝子に基づき生産される改変型PQQGDH酵素蛋白質に関し、かかる酵素は臨床検査や食品分析などにおけるグルコースの定量に有用である。

【0002】

【従来の技術】グルコースは血液中に存在し、糖尿病の重要なマーカーとして利用されている。また、微生物を用いる発酵生産においても微生物の増殖基質となるグルコースの定量がプロセスモニタリングにおいて重要な項目となっている。従来、グルコースはグルコースオキシダーゼ（以下GOD）あるいはグルコース6リン酸脱水素酵素（以下G6PDH）を用いる酵素法により定量されていた。しかし、GODを用いる方法では発色反応系に導くためにグルコース酸化反応にともない発生する過酸化水素を触媒するカタラーゼあるいはパーオキシダーゼを分析系に添加する必要がある。またGODを用いるバイオセンサーの開発も進められてきたが、反応が水溶液中の溶存酸素濃度に依存することから高濃度のグルコース試料には適さないこと、あるいは溶存酸素濃度によって計測される値に誤差が生じる可能性があった。一方、G6PDH分光学的手法に基づくグルコース定量に用いられてきたが、反応系に補酵素であるNAD(P)を添加しなければならないという煩雑性があった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】これにまでのグルコー

ス酵素定量方法に用いられてきた酵素にかわる新たな酵素としてPQQGDHの応用が注目されている。PQQGDHは補酵素結合型の酵素であり、また酸素を電子受容体としないことから、グルコースセンサーの認識素子をはじめとして、分析分野への応用が期待されている。特にE. coli由来のピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素PQQGDHはその構造遺伝子が知られており（AM. Cleton-Jansen et al., J. Bacteriol. (1990) 172, 6308-6315）、また熱安定性の点で改良が可能なが指摘されている（K. Sode et al., FEBS Lett. (1995) 364, 325-327）ことから、応用が期待されている。しかし、E. coli由来PQQGDHはグルコース以外の糖とも反応することから（Ameyama et al., Agric. Biol. Chem. (1986) 50, 49-57）、基質特異性の点で問題があった。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者はこのような従来のPQQGDHを改良して臨床検査や食品分析などに応用できる改変型PQQGDHの開発に鋭意研究を行なった。E. coli由来のPQQGDHの変異を導入した酵素のうち基質特異性のきわめて高い酵素をえることに成功した。即ち、E. coli由来のPQQGDHの772番目から778番目のアミノ酸配列-Ala-Gly-Gly-His-Gly-Ser-Phe-の775番目のヒスチジン残基をアスパラギン、アスパラギン酸、セリン、チロシン、又はリジンから選択されるアミノ酸残基で置換した改変型PQQGDH酵素蛋白質をコードする遺伝子および改変型PQQGDHの構造遺伝子に基づき生産される改変型PQQGDH酵素蛋白質はグルコース以外の糖とはほとんど反応せず、かつグルコースに対して高い酸化活性を有していることから、グルコースの高感度かつ高選択的な測定に应用できる。改変する部位として775番目のヒスチジンに着目した理由として次の点が挙げられる。これまでにGluconobacter oxydans（グルコンバクターオキシダンス；以下G. oxydans）由来PQQGDHにおいてその構造遺伝子の787番目のヒスチジン残基がアスパラギン残基に自然変異した変異酵素の基質特異性が天然型のG. oxydans由来PQQGDHの基質特異性に比べて低くなり、グルコース以外の糖との反応性が高くなったという報告があった（AM. Cleton-Jansen et al., Mol. Gen. Genet. (1991) 229, 206-212）。したがってこの部位はG. oxydans由来PQQGDHの基質の認識において重要な役割をになっていると考えられた。一方、G. oxydansの787番目におけるヒスチジン残基はE. coli由来PQQGDHにおいては775番目のアミノ酸残基に相当し、G. oxydans由来PQQGDHと同様にヒスチジン残基である（G. E. Cozier and C. Anthony, Biochem. J. (1995) 312, 679-685）。しかし、G. oxydans由来PQQGDHがグルコース以外の糖とはほとんど反応しないのに対し（Ameyama et al., Agric. Biol. Chem. (1981) 45, 851-861）、E. coli由来PQQGDHはその他の糖とも反応する。このことから、E. coli由来PQQGDHの775番目に相当するヒスチジン残基の基質特異性の役割はG.

10

20

30

40

50

oxydans由来PQQGDHの778番目のヒスチジン残基の役割とは異なっていると考えられた。したがって、E. coli由来PQQGDHの775番目のヒスチジン残基を他のアミノ酸に置換することによって引き起こされる酵素の性質の変化はまったく予知できるものではなかった。本発明に示すように、E. coli由来PQQGDH 775番目のアミノ酸残基をアスパラギン残基に置換したところ、改変型PQQGDHの基質特異性は高まり、G. oxydans由来PQQGDHにおいてみられた変異の効果とは全く正反対の効果であった。

【0005】改変型PQQGDHの構造遺伝子

本改変型酵素の構造遺伝子は従来報告されているE. coli由来PQQGDHの772番目から778番目のアミノ酸配列-Ala-Gly-Gly-His-Gly-Ser-Phe-の775番目のヒスチジン残基をコードする塩基配列がアスパラギン、アスパラギン酸、セリン、チロシン、又はリジンから選択されるアミノ酸残基をコードする塩基配列に置換された構造を有している。E. coli由来PQQGDHの遺伝子において775番目のヒスチジン残基をコードする塩基配列を合成オリゴヌクレオチドを用いてアスパラギン、アスパラギン酸、セリン、チロシン、又はリジンから選択されるアミノ酸残基をコードする塩基配列に置換することによって当該遺伝子を構築した。これらを各々、H775N、H775D、H775S、H775YおよびH775Kと命名した。

【0006】改変型PQQGDHの製造方法

E. coli由来PQQGDHの772番目から778番目のアミノ酸配列-Ala-Gly-Gly-His-Gly-Ser-Phe-の775番目のヒスチジン残基がアスパラギン、アスパラギン酸、セリン、チロシン、又はリジンから選択されるアミノ酸残基で置換した改変型PQQGDH酵素蛋白質の構造遺伝子を遺伝子発現用のベクタープラスミドに挿入し、これをE. coliに形質転換した後、形質転換体を培養する。培養液から遠心分離などで菌体を回収した後、菌体をフレンチプレスなどで破砕する。これを超遠心分離し、膜画分を得る。得られた膜画分を界面活性剤の存在下で攪拌し、可溶化し可溶化膜画分を得る。こうして得た可溶化膜画分を例えば陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製することにより、改変型PQQGDHを調製する。

【0007】基質特異性

E. coli由来PQQGDHの772番目から778番目のアミノ酸配列-Ala-Gly-Gly-His-Gly-Ser-Phe-の775番目のヒスチジン残基がアスパラギン、アスパラギン酸、セリン、チロシン、又はリジンから選択されるアミノ酸残基で置換した改変型PQQGDH酵素蛋白質をコードする遺伝子に基づき生産される改変型PQQGDH酵素蛋白質は基質特異性において従来報告されているE. coli由来PQQGDHとは異なっている。グルコースに対する活性を100としての各種糖類に対する相対活性を末尾表1に示す。これらの改変型PQQGDHはグルコース以外の糖とはほとんど反応しない。

【0008】

【発明の効果】改変型PQQGDHはグルコースと特異的に反応することから、グルコースの高感度かつ高選択的な酵素定量法に有用である。ひいては本酵素を用いるグルコースセンサーの開発に利用できる。

【0009】

【実施例】以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0010】実施例1

10 改変型PQQGDH遺伝子の構築

構造既知のE. coli由来PQQGDHの構造遺伝子をもとに常法に従って部位特異的変異法により775番目のヒスチジン残基をコードする塩基配列をアスパラギン、アスパラギン酸、セリン、チロシン、又はリジン残基をコードする塩基配列に置換した。まず、ベクタープラスミド pKF18k (宝酒造社) にE. coli DH5 α 由来PQQGDHの構造遺伝子 (K. Sode and H. Sano. Biotechnol. Lett. (1994) 16, 455-460) の一部であるAvaI-HindIII断片を組み込み、これをテンプレートとした。このテンプレート 50fmolと宝酒造社製Mutan-Express Kmキットに付属のセレクションプライマー 5 pmol、リン酸化した末尾表2に示すターゲットプライマー 50pmolを全体 (20 μ l) の1/10量の同キットのアニーリングバッファーとともに混合し、100 $^{\circ}$ Cで、3分間の熱処理でプラスミドを変性させ、1本鎖にした。なお、この末尾表2に示したターゲットプライマーは当該遺伝子の相補鎖に相当する塩基配列を有し、3'側のCGT-3'から5'側の5'-AAAまでが772番目のAlaから778番目のPheまでのコドンの相補鎖である。セレクションプライマーはpKF18kのカナマイシン耐性遺伝子上にある二重のアンバー変異を復帰させるためのものである。これを5分間氷上に置き、プライマーをアニーリングさせた。これに3 μ lの同キットエクステンションバッファー、1 μ lのT4 DNA リガーゼ、1 μ lのT4 DNAポリメラーゼおよび5 μ lの滅菌水を加えて相補鎖を合成した。これをDNAのミスマッチ修復能欠損株であるE. coli BMH71-18 mutSに形質転換し、一晚振とう培養を行ってプラスミドを増幅させた。次に、ここから抽出したプラスミドをE. coli MV1184に形質転換した。以上の操作により得られたE. coli MV1184のコロニーからプラスミドを抽出した。そしてこれらのプラスミドについてシーケンスを行い、目的とした変異の導入を確認した。この断片を天然型PQQGDHの構造遺伝子のAvaI-HindIII断片と入れ替え、改変型PQQGDHの遺伝子を構築した。

【0011】実施例2

改変型酵素の生産

変異を含む酵素の構造遺伝子をE. coli用の発現ベクターであるpTrc99A (ファルマシア社) のマルチクローニングサイトに挿入し、構築されたプラスミドをPQQGDH生産能を欠失したE. coli PP2418株 (AM Cleton-Jansen et al. J. Bacteriol. (1990), 172, 6308-6315) に形質転換

した。これを例えば1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaClから成るL培地で形質転換体を培養する。培養には10lの卓上ファーマンターKMJ-10C-FPMII I (三ツワバイオシステム社製)を用いた。450mlのL培地(アンピシリン 50 μ g/ml、クロラムフェニコール 30 μ g/ml含有)で坂口フラスコを用い、37℃で一晩振とう培養した菌体をファーマンター中の、10mM MgCl₂、500 μ MPQQを含む7 lのL培地に植菌した。培養開始後約2時間でイソプロピルチオガラクトシドを終濃度0.3mMになるように添加し、その後1.5時間培養した。培養液から遠心分離(5000 \times g、10分、4℃)で菌体を回収し、この菌体を0.85%NaCl溶液で2回洗浄する。集菌した菌体をフレンチプレスで破碎し、遠心分離(10000 \times g、15分、4℃)で未破碎の菌体を除去した。これの上清を超遠心分離(160500 \times g (40000r.p.m.)、90分、4℃)し、膜画分を得た。これに0.1% (w/v) トライトン X-100 5mM MgCl₂、10mM リン酸緩衝液 pH7.0を、タンパク質100mgに対し1 mlになるように加えて氷上で30分間攪拌し、膜画分を洗浄した。これを先と同様の条件で超遠心分離し、得られた洗浄膜画分を1% (w/v) トライトン X-100 5mM MgCl₂、0.2MKCl 10mM リン酸緩衝液 pH7.0を、タンパク質100mgに対し1 mlになるように加えて氷上で30分間攪拌し、可溶化した。これを超遠心分離して非可溶化成分を除去し、可溶化膜画分を得た。こうして得た可溶化膜画分を0.1% (w/v) Triton X-100 10mM リン酸緩衝液 pH7.0で一晩透析する。透析したサンプルを0.1% (w/v) トライトンX-100 10mM リン酸緩衝液 pH7.0 (で平衡化した陰イオン交換クロマトグラフィー用充填カラムTSKgel DEAE-TOYOPEARL 650M (東ソー株式会社)に吸着させた。このカラムに1% (w/v) トライトンX-100 10mM リン酸緩衝液 pH7.0を750ml流した後、0~0.1MKClを含む0.1% (w/v) トライトン X-100 10mM リン酸緩衝液 pH7.0を用い、酵

素を溶出させた。流速は5ml/minで行った。これで得られた活性画分を0.2% (w/v) トライトンX-100 10mM リン酸緩衝液 pH7.0で一晩透析した。このようにして電気泳動的に均一な改変型PQQGDH蛋白質が得られる。

【0012】実施例3

酵素活性の測定

酵素活性の測定は0.2% (w/v) トライトン X-100 10mM リン酸緩衝液 pH7.0中においてPMS (フェナジンメトサルフェート)-DCIP (2, 6-ジクロロフェノールインドフェノール)を用い、DCIPの600nmの吸光度変化を追跡し、その吸光度の減少速度を酵素の反応速度とした。このとき、1分間に1 μ molのDCIPが還元される酵素活性を1ユニットとした。また、DCIPのpH7.0におけるモル吸光係数は16.3mM⁻¹とした。測定には分光光度計UV-1200 (島津製作所製)を用いた。

【0013】実施例4

基質特異性の検討

適量の精製酵素を5 μ MPQQ、10mM MgCl₂存在下で1時間以上ホロ化した。これを187 μ lずつ分注し、3 μ lの活性試薬(6mM DCIP 48 μ l, 600mM PMS 8 μ l, 0.2% トライトン10mM リン酸緩衝液 pH7.0 16 μ l)と各濃度の基質溶液10 μ lを加え、実施例3に示す方法で酵素活性を測定した。

【0014】実施例5

グルコースの分析

改変型PQQGDHを用いてグルコースを分析した実施例を図1に示す。方法は上述の酵素活性の測定法に準じ、DCIPの600nmの吸光度の変化を指標とした。図1に示されるように、改変型PQQGDHを用いることにより、グルコースの定量が行なえる。

【0015】

【表1】 改変型酵素の基質特異性

基 質	相対活性			
	R. coli由来PQQGDH	H775N	H775D	H775K
D-グルコース	100%	100%	100%	100%
D-マンノース	30%	1%	0%	0%
D-ガラクトース	33%	2%	0%	6%
D-キシロース	48%	4%	1%	16%
マルトース	14%	5%	3%	23%

【0016】

【表2】 変異導入に用いたターゲットプライマーの塩基配列

H775N 5'-CC-AAA-TGA-ACC-GTT-ACC-GCC-TGC-GG-3'
H775D 5'-CC-AAA-TGA-ACC-GTC-ACC-GCC-TGC-GG-3'
H775S 5'-CC-AAA-TGA-ACC-GGA-ACC-GCC-TGC-GG-3'
H775Y 5'-CC-AAA-TGA-ACC-GTA-ACC-GCC-TGC-GG-3'

H775K 5'-CC-AAA-TGA-ACC-TTT-ACC-GCC-TGC-GG-3'

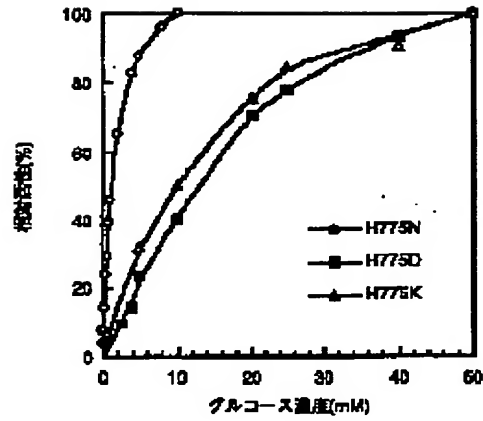
なお、この表に示したターゲットプライマーは当該遺伝子の相補鎖に相当する塩基配列を有し、3'側のTGC-3'から5'側の5'-AAAまでが772番目のAlaから778番目のPheまでのコドンの相補鎖である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明に係る改変型PQQGDHの酵素活性とグル

コース濃度との相関を示す図。

【図 1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶
 //(C 1 2 N 15/09
 C 1 2 R 1:19)
 (C 1 2 N 1/21
 C 1 2 R 1:19)
 (C 1 2 N 9/04
 C 1 2 R 1:19)

識別記号
 Z N A

F I